

## 15. Desarrollo farmacéutico y metabolismo: los problemas, las necesidades, las herramientas...

JOSÉ VICENTE CASTELL RIPOLL

### RESUMEN

El metabolismo es el factor que más influye en la farmacocinética de los fármacos, y el poder anticiparlo es esencial para el desarrollo de medicamentos más eficaces y seguros. Hay dos aspectos que son relevantes en el estudio del metabolismo: el perfil metabólico y su potencial inductor sobre los enzimas de biotransformación. Ambos tipos de estudio solo pueden llevarse a cabo en modelos celulares altamente diferenciados. Los hepatocitos humanos en cultivo son un excelente modelo del hígado capaz de predecir tanto el metabolismo como la inducción por fármacos en el hombre. Sin embargo su uso está dramáticamente limitado por la dificultad del acceso a tejido humano adecuado. Las líneas celulares hepáticas humanas, incluso las muy diferenciadas no constituyen una alternativa porque, sorprendentemente, no expresan actividades de biotransformación ni de inducción. La razón estriba en la pérdida de factores de transcripción y receptores nucleares hepáticos implicados en el mantenimiento del fenotipo hepático adulto. Trabajos previos nuestros han demostrado el papel de C/EBP $\alpha$ , HNF-3 $\gamma$ , y C/EBP $\beta$ , y cómo su reexpresión en hepatomas conlleva un aumento de la expresión de los genes CYP. Los hepatomas carecen asimismo de la expresión de CAR y PXR, receptores nucleares que regulan el fenómeno de la inducción de ciertos genes CYP, por lo que parece razonable que re-expresando en hepatomas dichos factores reguladores clave, sea posible generar modelos celulares útiles para estudios de metabolismo e inducción enzimática.

## 1. LOS PROBLEMAS: EL METABOLISMO DE FÁRMACOS, PRIMERA CAUSA DE LA VARIABILIDAD DE LA RESPUESTA CLÍNICA EN HUMANOS

Los fármacos, además de ejercer una acción farmacodinámica específica sobre un determinado tejido diana, sufren modificaciones químicas en su tránsito a través del organismo. Estos procesos (biotransformación) están catalizados por un grupo de enzimas denominadas genéricamente enzimas de metabolización de fármacos, y tienen lugar en mayor o menor grado en los distintos tejidos. Sin embargo, es el hígado en donde tiene lugar la mayor parte del metabolismo de dichos compuestos (1,2). Tal es el caso de los genes CYP, que si bien se expresan predominantemente en el hígado, también lo hacen en otros tejidos extrahepáticos tales como pulmón, riñón, intestino y placenta (3,4). Las monooxigenasas dependientes del citocromo P-450 (CYP) junto con las flavín monooxigenasas, citocromo reductasa, UDP-glucoronil transferasa, glutathion transferasa y sulfotransferasa, son los enzimas que más directamente están implicados en los procesos de biotransformación (5,6).

El fenómeno de la biotransformación es clave en el contexto de la *biodisponibilidad, variabilidad de la respuesta farmacológica y toxicidad de un fármaco*, y comprenderlo es crucial para el desarrollo de mejores medicamentos. La biotransformación es posiblemente la etapa más variable y la que mejor explica las diferencias en los niveles plasmáticos tras la administración de la misma dosis de un compuesto a varios individuos «normales». Parte de dicha variabilidad es debida a la existencia de genes polimórficos que se heredan mendelianamente, y que codifican para enzimas con una eficacia metabólica diferente frente a sus substratos. La frecuencia de dichos polimorfismos, excepción hecha del CYP 2D6 y la N-acetil transferasa es muy pequeña, si la comparamos con la variabilidad fenotípica observada en la población y responde, más bien, a diferencias en la expresión de genes «normales» que codifican para los enzimas del metabolismo de fármacos.

Como consecuencia de dicha variabilidad geno-fenotípica, la actividad de los distintos enzimas implicados puede ser claramente diferente entre distintos individuos, y en consecuencia la velocidad con la que un fármaco es biotransformado y el *perfil metabólico* puede ser muy dife-

rente. Ello explica, a grandes rasgos, el que una determinada dosis de fármaco sea terapéuticamente eficaz en unos individuos porque, como consecuencia de un balance entre absorción y metabolización/eliminación, se generan niveles plasmáticos adecuados, en otros sea ineficaz porque, una metabolización más rápida no permita alcanzar la concentración plasmática terapéutica, y en otros tóxico, porque un metabolismo insuficiente o anormal se traduce en niveles plasmáticos exagerados del fármaco o de alguno de sus metabolitos (7,8).

Parte de esa variabilidad fenotípica puede estar causada por los propios fármacos. Un determinado compuesto puede actuar como inductor/represor de los genes que codifican para los enzimas de biotransformación enzimática, de manera que tras su administración, los niveles de enzimas de biotransformación tanto de Fase I como II, pueden verse afectados (inducidos o reprimidos). Desde el punto de vista terapéutico, un fármaco inductor siempre presenta más dificultades en su manejo clínico. La inducción provoca, a su vez, un aumento del metabolismo y del aclaramiento de éste y/o de otros medicamentos co-administrados, lo que requiere reajustes de las dosis, con el consiguiente riesgo de sobredosificación, interacciones medicamentosas, y/o efectos tóxicos indeseados.

*La variabilidad en la expresión de enzimas de biotransformación en el ser humano: la regla, más que la excepción*

Posiblemente sean los genes CYP los mejor conocidos en cuanto a las causas de su diferente expresión en el ser humano. La superfamilia de genes CYP está subdividida en una serie de familias y subfamilias, de acuerdo a su homología en la secuencia de nucleótidos. En el ser humano hay 16 familias y 29 subfamilias identificadas. Los genes pertenecientes a las familias 1, 2 y 3 son los más directamente implicados en las reacciones de biotransformación de xenobióticos, y por ende del metabolismo de los fármacos (9,3). El citocromo CYP3A4 es la forma más abundante en el hígado (30-40% del total de proteína CYP) (10) seguida del CYP2E1. Los fármacos, pese a su diversidad estructural son biotransformados por un reducido número de CYPs (1A2, 2A6, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, y 3A4) (9).

Hay una variabilidad muy significativa en la actividad de los enzimas CYP en el ser humano. Parte de esta variabilidad es debida a la naturaleza polimórfica de algunos genes, que se heredan mendelianamente entre generaciones, y que presentan una distribución característica entre razas y subtipos humanos (Tabla 1). La manera más directa de confirmar la existencia de un polimorfismo en un determinado individuo es el análisis de la secuencia del DNA. En términos prácticos ello puede hacerse mediante amplificación por PCR de la secuencia polimórfica, seguido de un análisis mediante enzimas de restricción, o bien análisis genómico mediante chips de DNA.

El análisis fenotípico es más complejo de llevar a cabo en la práctica. La forma más simple, pero no siempre practicable, es la medida de la actividad enzimática en muestras de tejido (por ejemplo en biopsias). Sin embargo ello no siempre es factible y hay que recurrir a métodos indirectos, no invasivos, con los que estimar la actividad de un enzima. Un procedimiento habitual es la medida de la metabolización de un determinado compuesto *in vivo*, que sea metabolizado por un solo enzima, o que uno de cuyos metabolitos sea producido por un solo enzima. Solo hay unos pocos compuestos que cumplan con los requisitos necesarios y que al mismo tiempo puedan ser administrados a seres humanos (11).

TABLA 1  
*Polimorfismos de los CYP*

<i>Enzima</i>	<i>Variantes alélicas</i>	<i>Variante mayoritaria</i>	<i>Frecuencia de alelos</i>	<i>Fenotipo</i>
CYP1A2	13	<i>CYP1A2*1B</i>	12% (Japoneses)	actividad disminuida
CYP2A6	22	<i>CYP2A6*2</i>	1-3% (Caucásicos)	Enzima inactivo
CYP2C9	6	<i>CYP2C9*3</i>	7-9% (Caucásicos)	Especificidad de sustrato alterada
CYP2C19	11	<i>CYP2C19*2</i>	13% (Caucásicos)	Enzima inactivo
CYP2D6	75	<i>CYP2D6*4</i>	12-21% (Caucásicos)	Enzima inactivo
CYP2E1	13	<i>CYP2E1*3</i>	<1% (Caucásicos)	Sin efectos
CYP3A4	25	<i>CYP3A4*2</i>	4% (Caucásicos)	Afinidad por sustrato disminuida

Referencia: Home Page of the Human Cytochrome P-450 (CYP) Allele Nomenclature Committee ([www.imm.ki.se/CYPalleles](http://www.imm.ki.se/CYPalleles)).

La variabilidad en la expresión de los genes CYP es más bien la norma que la excepción. Así, por ejemplo, el análisis del contenido de CYP mRNA y de actividad enzimática de un banco de hígados revela la existencia de una variabilidad considerable tanto en el contenido en proteína CYP como en el de mRNA de cada uno de las diferentes isoformas entre los diferentes hígados humanos, lo que hace difícil definir qué es un hígado *normal* (Figura 1).

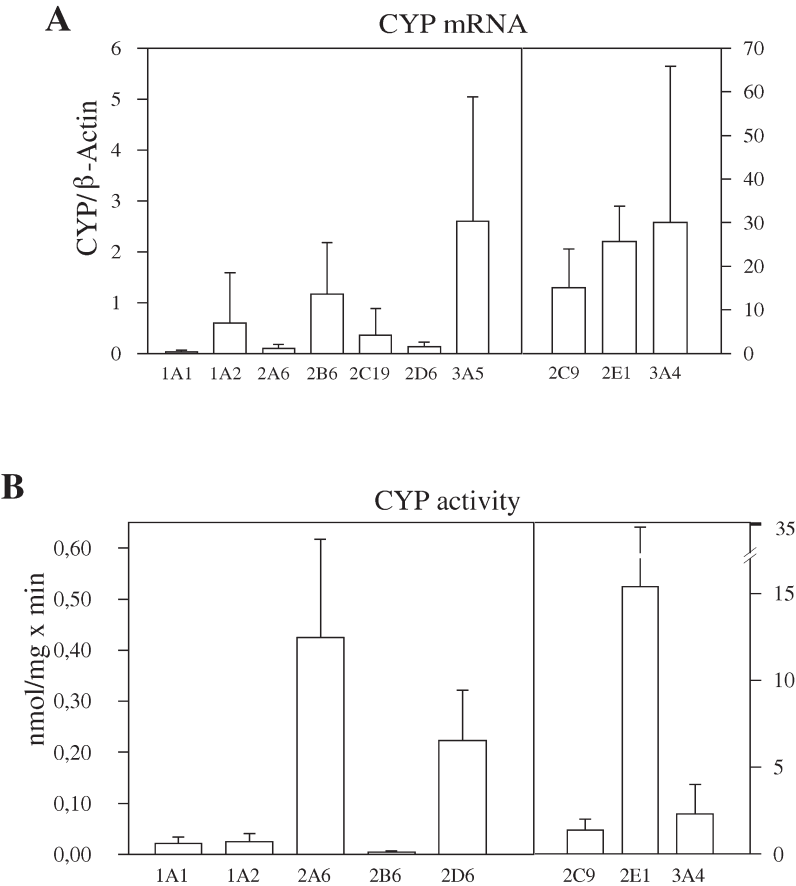


FIGURA 1. Variabilidad de los genes CYP en hígados humanos. Muestras de hígados humanos fueron procesadas para extraer el RNA total, y los mRNAs específicos fueron determinados por PCR cuantitativo [48]. En paralelo, se prepararon microsomas de esos mismos hígados y se midieron las actividades P-450 mediante el uso de sustratos específicos [49]

Genes como el CYP3A4, del que no se conocen polimorfismos inactivos, presentan una considerable variabilidad en cuanto la actividad enzimática, fruto mas bien de una diferencia en la expresión de un gen *normal* (Figura 2). CYP2D6, por el contrario es un gen polimórfico con isoformas

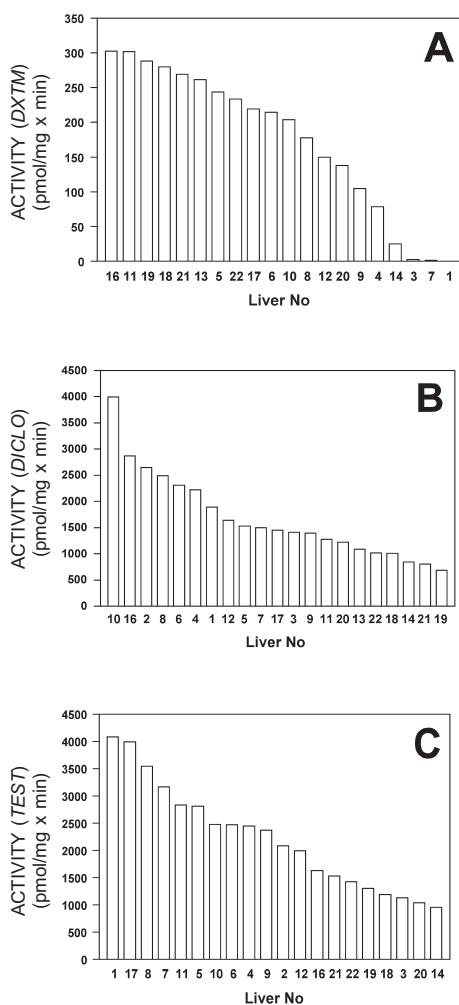


FIGURA 2. Variabilidad de las actividades de metabolismo de fármacos en hígados humanos. Microsomas de un banco de hígados humanos fueron utilizados para determinar las distintas actividades enzimáticas utilizando sustratos específicos. CYP2D6 (dextrometorfano O-demetilasa, panel A), CYP2C9 (diclofenac 4'-hidroxilasa, Panel B) y CYP3A4 (testosterona 6b-hidroxilasa, Panel C). Las actividades obtenidas de cada hígado se representan en orden decreciente, con el fin de visualizar la variabilidad interindividual.

no activas catalíticamente, lo que explica que aproximadamente un 10% de la población pueda ser catalogado como un *metabolizador lento*. La incidencia del polimorfismo en el CYP2C9 es muy reducida, y sin embargo la variabilidad fenotípica en el ser humano es considerable (Figura 2).

Tenemos, por tanto, genes cuya naturaleza polimórfica con isoformas no activas catalíticamente, permite explicar la diferente expresión fenotípica en función de los alelos que dicho individuo posee. Pero tenemos también genes, de los que no se conocen polimorfismos genéticos que resulten en genes inactivos, y sin embargo la variabilidad de expresión y/o actividad en los seres humanos es muy significativa. De hecho, esa variabilidad fenotípica es la predominante y mucho más frecuente e importante que la genotípica, cuando se examina un grupo de población.

#### *Las causas de dicha variación: La regulación basal de los genes y la inducida por fármacos*

El análisis detallado de los mecanismos de la regulación de los genes típicamente hepáticos ha permitido descubrir un significativo número de factores activadores de la transcripción que se caracterizan por poseer un dominio de unión a las regiones reguladoras de dichos genes hepáticos (12,13). Estos factores que por ser particularmente abundantes en los hepatocitos se les conoce como LETF's (*liver enriched transcription factors*), son actores principales en el control de la expresión *basal* de los genes en un determinado tejido. Generalmente forman homo— y heterodímeros con otros miembros de su familia; y/o muestran cooperatividad y sinergismo con factores de otras familias modulando así su especificidad y potencia trans-activadora.

El conocimiento adquirido acerca de la estructura de la región promotora de otros genes hepáticos típicos y la complejidad de su regulación, sugiere que la de los genes CYP podría ser también compleja. Por una parte está el hecho constatado de que en la región 5' de dichos genes existen secuencias consenso para muchos de los factores de transcripción hepáticos y receptores nucleares actualmente conocidos (14,15), de lo que cabe deducir que el control de los genes CYP hepáticos dependerá muy probablemente de más de un factor (Ver capítulo 6). Cua-

tro factores, C/EBP $\alpha$ , HNF3, HNF1 y HNF4, están implicados de manera muy directa en el control de la expresión *basal* de los CYP en el hígado, dado que las secuencias consenso de unión al DNA aparecen en la región 5' de casi todos los genes CYP y su expresión está estrechamente asociada al estado diferenciado del hepatocito (16,17,18,19,20,21).

En segundo lugar está el hecho de que muchos de esos factores tienen entre sí una relación compleja y que su mecanismo de transactivación implica relaciones de sinergia, cooperatividad pero también de antagonismo (22,23). Así por ejemplo, el análisis mutacional de la región *enhancer* del gen de la albúmina indica que el factor HNF-1 coopera con HNF-3 $\alpha$  para inducir un aumento de la transcripción. De manera similar, C/EBP $\beta$  interacciona con Sp1 formando un complejo que es indispensable para la activación del promotor del CYP2D5 de ratón (24). Además, a esta serie de interacciones directas, hay que añadir los fenómenos de transactivación entre factores dentro de una posible red jerárquica (25). El ejemplo clásico es el de la transactivación de HNF1 por HNF4 (26,27).

No existe, una explicación molecular razonable a las diferencias fenotípicas en la expresión basal de algunos CYPs. Una primera hipótesis sería la existencia de niveles distintos de dichos factores reguladores clave, que condicionaría la expresión de los genes CYP. Aunque esta explicación es la más fácil de aceptar, es poco verosímil, porque de ser cierta otros muchos genes regulados por estos mismos factores de transcripción se verían afectados, y éste no es el caso. La variabilidad interindividual que se observa en la expresión de los genes CYP no es lo habitual en los otros genes. Si bien no se tiene constancia de polimorfismos en la región reguladora proximal de dichos genes, no cabe excluir que existan a distancias mayores en la estructura del DNA, o que existan polimorfismos en otras proteínas reguladoras de la expresión de dichos genes.

La otra causa de variabilidad es la derivada de la regulación de la expresión de dichos genes por los propios fármacos. Constituye ciertamente un caso singular en la biología molecular de las células, el que sustancias ajenas al metabolismo celular (*xenobióticos*) ejerzan un control sobre la expresión de aquellos genes que, en última instancia, se encargan de metabolizarlas para facilitar su eliminación. Los mecanismos por los que los fármacos actúan regulando la expresión de los genes CYP son varios, y se yuxtaponen a mecanismos de regulación existentes en las cé-



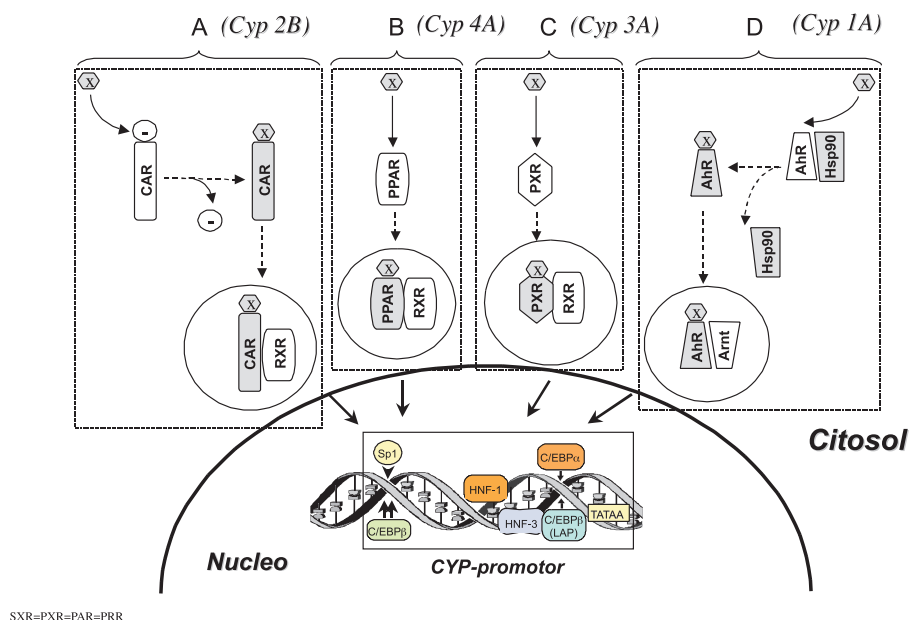


FIGURA 3. *Mecanismos generales de la inducción de genes por xenobióticos.*

lulas, ciertamente con otra finalidad. A excepción del CYP2E1, cuya inducción, no es sino básicamente el resultado de una estabilización del correspondiente mRNA, en los otros genes CYP el aumento de la actividad enzimática es reflejo de una mayor cantidad de enzima, fruto de una transcripción más activa del gen.

El hallazgo clave para explicar cómo ocurre el fenómeno de la inducción enzimática ha sido la identificación de receptores nucleares que pueden interactuar con xenobióticos inductores (medicamentos) y con las regiones reguladoras de los genes CYP inducibles (28;29).

Se conocen cuatro posibles vías por las que un xenobiótico puede inducir los genes CYP (Figura 3). La inducción de los de la familia CYP1 es la más simple en cuanto a que básicamente interviene un solo factor (AHH), una proteína «*basic helix-loop-helix*» que pertenece a la familia de factores PAS (Pre-Arnt-Sim).

La inducción del resto de genes CYP se realiza a través de mecanismos que implican a tres receptores huérfanos que pertenecen a la *superfa-*

*milia de receptores nucleares* (30): 1) CAR (*constitutive androstane receptor*) que participa en la inducción del CYP2B6, prototipo del efecto causado por el fenobarbital y otros muchos compuestos lipofílicos similares. 2) PXR (*pregnane nuclear receptor*) que activa los genes de la subfamilia CYP3A en respuesta a diversos compuestos químicos incluyendo ciertos esteroides naturales y sintéticos (31,32,33,34,35,36,37,38,39), 3) PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) que media la inducción de los genes CYP de la subfamilia CYP4A, y de la que los fibratos son moléculas representativas como inductoras de la proliferación de peroxisomas en rata. Otros receptores nucleares como el receptor de glucocorticoides o el receptor de vitamina D también pueden afectar o modular de un modo relevante la inducción de los CYPs por xenobióticos (40,41,42).

Los xenobióticos (entre ellos los medicamentos), cuando son capaces de unirse a alguno de estos receptores, son capaces de interferir en su mecanismo de acción. Lo pueden hacer de diversas maneras, por ejemplo uniéndose al receptor y activándolo (caso del PPXR, o del PXR), o bien desplazando a un ligando interno que actúa de represor (tal como algunos autores hipotetizan para el CAR). El resultado inmediato es la translocación al núcleo y la puesta en marcha de una cascada de acontecimientos que culmina con la unión de dicho receptor a la secuencia diana en el promotor de los genes CYP y su consiguiente transactivación, tal como esquemáticamente se describe en la Figura 3 para cada familia de receptores nucleares.

### **Las necesidades: Las limitaciones actuales a un desarrollo farmacéutico más seguro**

El desarrollo de un nuevo medicamento es una empresa de elevado riesgo que requiere un notable esfuerzo humano y de recursos. La probabilidad de que un compuesto termine convirtiéndose en un nuevo medicamento, es francamente reducida. Como causas principales de la interrupción del desarrollo de un nuevo fármaco en su fase clínica, contribuye más la existencia de efectos adversos inesperados, que la falta de eficacia terapéutica. El estudio del metabolismo de un fármaco que debiera formar parte del desarrollo preclínico, con frecuencia se lleva a cabo solo cuando el fármaco ha entrado ya en la fase clínica. Y el metabolismo puede ser una de las razo-

nes por las que el desarrollo de un fármaco se vea finalmente abortado, como causante de efectos adversos idiosincrásicos consecuencia de un diferente metabolismo entre individuos y o interacciones con otros fármacos.

La variabilidad existente en el ser humano en los enzimas de biotransformación hace que la farmacocinética y el perfil metabólico de un compuesto pueda diferir sensiblemente entre individuos, máxime si el metabolismo de ese fármaco ocurre mayoritariamente a través de enzimas cuya expresión conocemos es muy variable en el ser humano. Parece por tanto obvio que algo que puede saberse en un estadio pre-clínico del desarrollo (qué enzimas están implicados, en qué medida, qué metabolitos se forman), se conozca avanzada la fase clínica, aun a riesgo de descubrir entonces que el compuesto presentará un metabolismo y farmacocinética muy variable, con la consiguiente mayor dificultad de manejo clínico. En la decisión de la elección de candidato a fármaco, debe pues tenerse presente ese posible escenario.

Los fármacos rara vez se administran aislados, por lo que es posible que la presencia de un compuesto influya de manera determinante en el metabolismo del otro. Compuestos que comparten una misma ruta de biotransformación (por ejemplo son sustratos de un mismo CYP), y lo hacen mayoritariamente a través de una sola ruta, son compuestos claramente candidatos a presentar fenómenos de interacción fármaco-fármaco. La presencia de uno de ellos, al interferir en el metabolismo del otro hace que la misma dosis administrada se traduzca en niveles plasmáticos mucho más elevados o en la producción de metabolitos minoritarios (producidos a través de otras vías minoritarias), en cantidades anormalmente elevadas. La literatura científica está llena de casos de nuevos fármacos que han debido ser retirados, porque uno ya existente en el mercado al ser co-administrado con el nuevo ha provocado dichos efectos inesperados.

Bajo la creencia de que el metabolismo en animales es *escalable* al ser humano y el perfil metabólico extrapolable al hombre, con frecuencia ocurre que se detectan anomalías en el ser humano que no se habían observado en los ensayos pre-clínicos con animales. En nuestra experiencia personal, son precisamente esas diferencias en el metabolismo entre la especie animal y el hombre la causa más habitual de aparición de efectos tóxicos en humanos que no se habían observado en animales. Pese

a ello, todavía ocurre que con datos obtenidos con modelos animales quizás no totalmente aplicables al hombre, la industria ha de tomar decisiones sobre si seguir o no adelante con el desarrollo de un determinado fármaco.

Así pues hay tres cuestiones básicas que deben examinarse durante el desarrollo de un nuevo fármaco: a) conocer el metabolismo del compuesto, porque de él depende directamente la biodisponibilidad, la farmacocinética y su eficacia clínica; b) conocer si los enzimas implicados en su metabolismo son enzimas con expresión variable o inducible, porque harán que el compuesto sea clínicamente más difícil de manejar. Finalmente, c) conocer si dada la diferente expresión de los enzimas implicados, podrán existir perfiles metabólicos singulares, interacciones con el metabolismo de otros fármacos, y/ efectos tóxicos indeseados.

Obvio es reconocer que en la medida sea técnicamente factible contestarlas con un esfuerzo humano y económico asumible, se estará contribuyendo a una elección de mejores candidatos a fármacos, no solamente eficaces, sino también seguros.

### **Las herramientas: ¿En qué modelos puede estudiarse el metabolismo y la inducción por fármacos?**

Puesto que el destinatario final de los fármacos es el hombre, no es posible realizar ensayos en humanos hasta fases avanzadas de su desarrollo y dado que los estudios de metabolismo e inducción con animales muchas veces no son extrapolables al hombre, se hace necesario disponer de modelos que reproduzcan el comportamiento que cabe esperar en el ser humano. El uso de microsomas obtenidos de hígado humano, primero, y ahora las líneas manipuladas genéticamente para expresar enzimas, son las herramientas clásicas de los estudios de metabolismo y permiten establecer qué enzimas pueden estar implicados en el metabolismo de un determinado compuesto y qué metabolitos se producen tras esa reacción. Sin embargo, dan una visión parcial del mismo, y no son adecuados para estudios de inducción. En efecto, solo los hepatocitos humanos responden de manera eficaz a *inductores* enzimáticos, y solo en ellos (bien midiendo la actividad enzimática o la expresión de los co-

respondientes mRNA), es posible determinar con razonable seguridad si un compuesto será o no inductor en el ser humano (43,44).

También los *hepatocitos humanos* posiblemente son el mejor modelo del que disponemos para predecir el *perfil metabólico* de un nuevo fármaco en el hombre, así como su potencial inductor (45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53). Este modelo, que es una herramienta única para estudios de metabolismo, hepatotoxicidad e inducción, es de difícil accesibilidad para la mayoría de los laboratorios. Si tenemos presente que se trata de cultivos no proliferantes, lo que conlleva la necesidad de tener que disponer de tejido humano de manera continuada, se comprende que este modelo quede, en la práctica, fuera de uso generalizado y limitado a laboratorios cualificados para el estudio de problemas singulares.

Es posible imaginar alternativas al cultivo primario de hepatocitos humanos, tales como hepatomas humanos o hepatocitos humanos inmortalizados. En ambos casos la idea clave es la de disponer de células hepáticas humanas, funcionales y al tiempo con crecimiento ilimitado. Existen diversas líneas celulares hepáticas aisladas de hepatomas humanos, alguna de ellas con un buen grado de diferenciación. Sin embargo, la expresión de enzimas de metabolismo de fármacos es en todas ellas mucho menor que en hepatocitos e hígado humano. Por lo general, esas líneas expresan solo CYP1A1 y una muy escasa actividad de enzimas de conjugación. Más aún, su respuesta a inductores enzimáticos está restringida a la familia CYP1A, expresando el isoenzima 1A1, en lugar del 1A2, que es la forma que se expresa en hepatocitos diferenciados. Todo ello pone en evidencia que ninguna de esas líneas celulares «diferenciadas» tiene las características necesarias para ser útiles en un estudio predictivo del metabolismo y potencial inductor de un nuevo fármaco. Tampoco la immortalización de hepatocitos adultos o fetales ha tenido éxito científico significativo, pese a las distintas estrategias usadas: se logran hepatocitos inmortalizados, pero que sistemáticamente no expresan el fenotipo deseado (Tabla 2). Éxitos parciales se han conseguido con algunos hepatomas que espontáneamente se diferencian en cultivo (54), o bien tras la transformación espontánea que ocurre en los hepatocitos de animales transgénicos que han sido transfectados con oncogenes, o factores de crecimiento (55).

TABLA 2  
Actividades basales de biotransformación de fármacos en líneas celulares hepáticas  
y de hepatocitos humanos (\*)

Línea celular	AEPOX	AHH	BROD	EROD	ECOD	PROD	mEH	pNPH	GSH-t	UDPGt	Sulfo-T	N-AcT
Hepatocitos	340±130 <sup>11</sup>	2.93±0.99 <sup>3</sup>	1.38±0.33 <sup>3</sup>	3.1±2.5 <sup>3</sup>	13.2±2.3 <sup>2</sup>	3.28±1.76 <sup>2</sup>	180±72 <sup>2</sup>	89±42 <sup>2</sup>	301±1122 <sup>2</sup>	3.6±0.4 <sup>9</sup>	0.01 <sup>3</sup>	
HepG2		8.5 <sup>4</sup>	2-25.6	0.90 ± 0.4 <sup>4</sup>	0.069±0.06 <sup>4</sup>	0.23 ± 0.1 <sup>4</sup>	75 ± 8 <sup>4</sup>	8 <sup>7</sup>	34 ± 7 <sup>4</sup>	1.5-100 <sup>8,9</sup>	0.2-978 <sup>8,9</sup>	0.025-1 <sup>10</sup>
MzHep				0 <sup>4</sup>	0.20 ± 0.10 <sup>4</sup>	0 <sup>4</sup>		0 <sup>4</sup>	134± 34 <sup>4</sup>			
Chang									118 <sup>8</sup>			
Hep3B	0.13 <sup>10</sup>											
HuFoe-15					135 <sup>12</sup>				3.2 <sup>12</sup>			
PLC/PRF/5	0.045 <sup>11</sup>	0.82 <sup>11</sup>										

Las actividades AHH, AEPOX, EROD, ECOD, pNPH y PROD están expresadas como pmol/mg protein x min. Las actividades GST, UDPG-t y mEH están expresadas como nmol/mg protein x min. En hepatocitos humanos, las actividades AHH y EROD están asociadas a CYP1A1/2, mientras que ECOD está asociado a CYP1A1/2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9 CYP2E1 y CYP3A3/4/5. La actividad BROD, y en parte PROD, es específica de CYP2B6. La actividad PNP es dependiente de CYP2E1.

(\*) Reproducido de: J.V. Castell, R. Jover, R. Bort and M.J. Gómez Lechón. *The challenge of using hepatic cell lines for drug metabolism studies*. In: COST B1 European Symposium on the prediction of drug metabolism in man: progress and problems. A.R. Boobis, P. Kreners, O. Pelkonen and K. Pitkan eds, pp 77-92. Office for Official Publications of the European Community, Brussels 1999. ISBN 92-828-5114-1.

Referencias de la Tabla 2

1. Beaune Ph., Kreners P. G., Kaminsky L., De Grave J., Añbert A. and Guengerich P.(1986) Comparison of monooxygenase activities and cytochrome P-450 isozyme concentration in human liver microsomes. *Drug Metab. Disp.* 14: 437-442
2. Gómez-Lechón M. J. Donato M. T., X. Ponsoda, Ricardo Fabra, R. trullenque and Castell J. V. (1997). Isolation, culture and use of human hepatocytes in drug research.. In *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*129.154. (J. V. Castell and M. J. Gómez-Lechón, eds.) Academic Press, New York

3. Monteith D.K., Michalopoulos G. and Strom S.C. (1990) Conjugation of chemical carcinogens by primary cultures of human hepatocytes. *Xenobiotica* 20: 753-759.
4. Donato M. T., Bassi A.M., Gómez-Lechón M. J., Penco S., Herrero E., Adamo D., Castell J. V. and Ferro M. (1994) Evaluation of the xenobiotic biotransformation capability of six rodent hepatoma cell lines in comparison with rat hepatocytes. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 30A: 574-580.
5. Doostdar H., Grant M., Melvin W.T., Wolf C. R. and Burke M. D. (1993) The effect of inducing agents on cytochrome P-450 and UDP-glucuronyltransferase activities in human HepG2 hepatoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 46: 629-635.
6. Doodstar H., Duthie S. J., Burke M. D., Melvin W.T. and Grant M. H. (1988) The influence of culture medium composition on drug metabolism enzyme activities of the human liver derived HepG2 cell line. *FEBS Lett.* 241: 15-18.
7. Roe A.L., Snawder J.E., Benson R.W., Roberts D.W. and Casciano D.A. (1993). HepG2 cells: an in vitro model for P-450-dependent metabolism of acetaminophen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 15-19.
8. Grant M.H., Duthie S.J., Gray A.G. and Burke D. (1988) Mixed function oxidase and UDP-glucuronyltransferase activities in the human HepG2 hepatoma cell line. *Biochem. Pharmacol.* 37: 4111-4116.
9. Dharmesh S.M., Shelton T. P. and Boenzinger J. U. (1993) Co-ordinate and restricted expression of the ProXaaArg/Lys-specific Gal/Nac-transferase and the GalNac61, 2Man(alpha)-4-sulphotransferase. *J. Biol. Chem.* 268: 17096-17102.
10. Coroneos E., Gordon J. W., Kelly S.L., Wang P.D. and Sim E. (1991). Drug metabolizing N-acetyltransferase activity in human cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1073: 593-599.
11. Limborsch S. (1983) Benzo(a)pyrene- and aldrin-metabolizing activities in cultured human and rat hepatoma cell lines. *Cancer Inst.* 71: 281-286.
12. Glatt H.R., Gempferlein I., Setiabudi F., Platt K. L. and Oesch F. (1990). Expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in propagable cell cultures and induction of micronuclei by 13 compounds. *Mutagenesis* 5: 241-249.

## ¿Por qué no se expresan los genes CYP en hepatomas?

Por sorprendente que pudiera parecer, los múltiples intentos de inmortalizar hepatocitos humanos no han dado los resultados esperados y las células resultantes expresan menos funciones hepáticas que muchos de los hepatomas. Por otra parte, muchos de los hepatomas naturales «diferenciados» capaces de expresar muchas de las funciones hepato-específicas, no expresan los genes CYP pese a existir dichos genes en su genoma. La inducción de CYPs por fármacos modelo tampoco ocurre en estas células indicando que los mecanismos que controlan este fenómeno no son funcionales en hepatomas.

¿Por qué los genes CYP no se expresan en esas células?, ¿Por qué los mecanismos de inducción están ausentes en estas células?. Hay varios elementos de razonamiento y diversas evidencias experimentales de nuestro laboratorio que señalan un posible camino para entender por qué esto ocurre, y cómo cabría actuar para alcanzar el objetivo antes señalado. Cabe imaginar distintas razones (Figura 4):

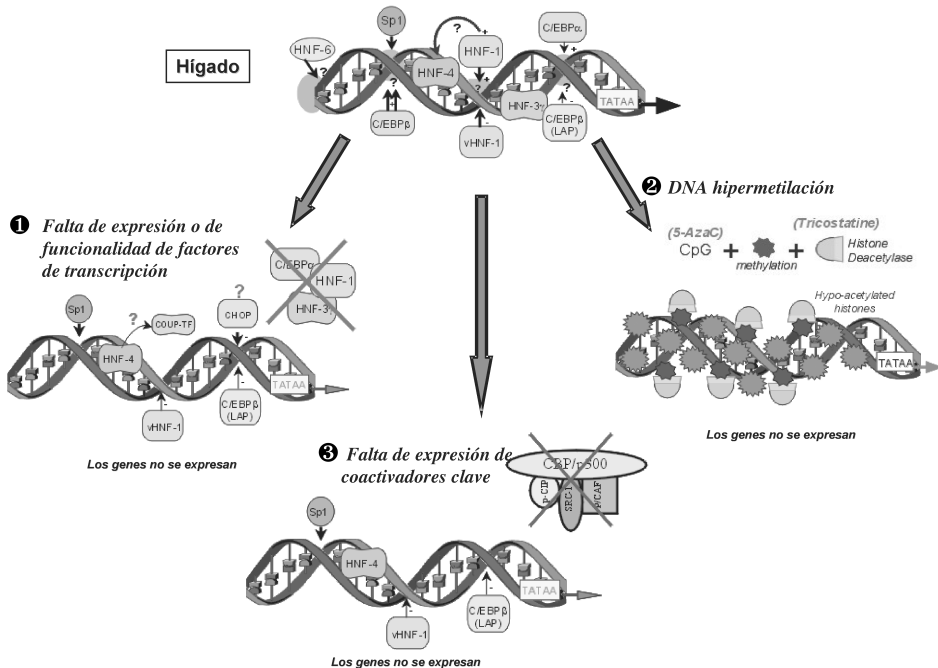


FIGURA 4. Posibles mecanismos que explican la falta de expresión basal e inducida de los genes CYP en hepatomas.



1. La pérdida de expresión del citocromo P-450 en los modelos hepatocelulares es un fenómeno de *desdiferenciación* que está asociado a una alteración de la expresión de *factores de transcripción hepato-específicos*. Varios estudios han revelado que: a) los niveles de expresión del citocromo P-450 en hepatocitos en cultivo decrecen en paralelo con los de factores de transcripción clave (56); b) las modificaciones en las condiciones de cultivo que prolongan la expresión de los citocromos (por ejemplo, cultivos en geles de colágeno) van asociados a una mayor expresión de dichos factores de transcripción (57); c) los niveles de expresión de algunos de esos factores potencialmente importantes son, en los hepatomas humanos (ej. HepG2), considerablemente inferiores a los valores medidos en los hepatocitos. (56); d) la expresión de estos factores de transcripción aumenta en hepatomas que poseen la característica de rediferenciarse en cultivo (ej. BC2). Este incremento en factores de transcripción precede un incremento notable en los niveles de CYPs (54).
2. También existen factores de transcripción que podrían tener un papel represor en la expresión de los CYPs. Por ejemplo, se conocen diversas isoformas o variantes de las proteínas C/EBP que carecen de *dominio de transactivación* y que, por lo tanto, son dominantes-negativos naturales. Estas variantes traduccionales tienen un nivel de expresión distinto en hepatocitos y hepatomas. Otro ejemplo similar sería el de los factores de la familia COUP-TF que pueden competir y desplazar de su sitio de unión al factor HNF4, un regulador general de la expresión de los CYPs en hepatocitos (58).
3. Una tercera posibilidad que podrían conducir a la nula transactivación de los CYPs en hepatomas es la del aumento de metilación o de desacetilación de histonas en los genes CYP, o la de un descenso de los coactivadores con actividad acetiltransferasa (59).
4. Por último, y en referencia a la falta de inducción de genes CYP en hepatomas, también existe la posibilidad de que los receptores nucleares implicados en estos mecanismos de inducción (CAR, PXR, etc.) también estén poco expresados o des-regulados en hepatomas (60).

Es por tanto imaginable que, actuando sobre las líneas celulares de hepatomas humanos, de manera que re-expresen dichos factores, o modificando la acetilación de los genes, sea posible lograr que dichas células expresen los enzimas del metabolismo de fármacos, lo que les convertiría en una herramienta útil de cara a predecir el metabolismo humano (Figura 5). Evidencias de que esto podría ser así han sido descritas por nuestro laboratorio recientemente (61).

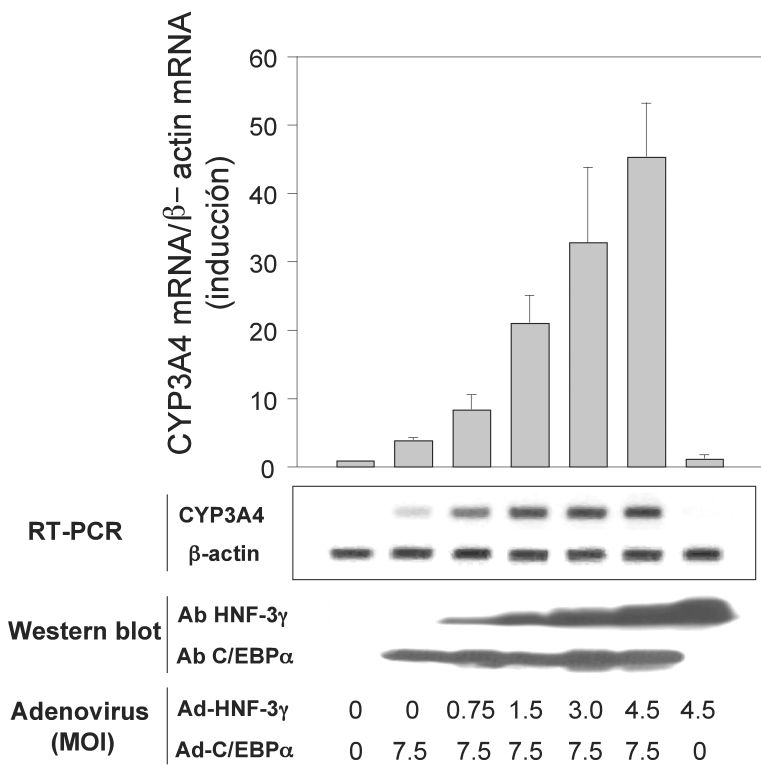


FIGURA 5. *Expresión de genes CYP en hepatomas.* El reestablecimiento de niveles adecuados de factores de transcripción en hepatomas humanos, mediante transfección usando vectores adenovirales, se traduce en la expresión de genes CYP, prácticamente inexistente en los hepatomas.

TABLA 3  
*Actividades de biotransformación en hepatocitos humanos immortalizados (\*)*

<i>Estrategias utilizadas</i>	<i>Gen transformante</i>	<i>Actividades de metabolización de fármacos</i>	<i>Referencias</i>
Transfección con secuencias virales de DNA transformante	Antígeno T grande de SV40	No analizado	1-3
		Expresión de enzimas de conjugación	4,5
	Antígeno T grande de poliovirus	Indetectable	6,7
		Expresión de CYP y enzimas de conjugación	8,9
		No detectado	10
Transfección con SV40 mutante	Antígeno T grande mutado de SV40 temerosensible; diferenciación vs. crecimiento a temperatura permisiva	No detectado	7,11
Transfección con oncogenes	Ha-rasEJ	Metabolismo de acetaminofluoreno	12
	c-Ha-ras, N-myc	No detectado	11
	met truncado	No detectado	13
Hepatocitos	Fusión de hepatocitos y hepatomas	ND	14-18
		Expresión de CYP y enzimas de conjugación	19
Aislamiento de líneas celulares hepáticas de animales transgénicos que sobre expresan genes transformantes	Mutante del antígeno T grande de SV40 temerosensible.	No detectado	20
	Expresión tisular dirigida de factores de crecimiento (TGF $\alpha$ , hGH)	No detectado	21-23
	Antígeno T grande y 1 pequeño de SV40 bajo el control del promotor de PK-L	Expresión de CYP y enzimas de conjugación	25-26
	Uso de mutantes del receptor de estrógenos (c-myc and p53 activation)	Expresión de CYP	27
	Factores de crecimiento tempranos (c-met protooncogen)	No detectado	28

(\*) Reproducido de: J.V. Castell, R. Jover, R. Bort and M.J. Gómez Lechón. *The challenge of using hepatic cell lines for drug metabolism studies*. In: COST B1 European Symposium on the prediction of drug metabolism in man: progress and problems. A.R. Boobis, P. Kremers, O. Pelkonen and K. Pithan eds. pp 77-92. Office for Official Publications of the European Community, Brussels 1999. ISBN 92-828-5114-1.

*Referencias de la Tabla 3*

1. Anderson K., Yin L.m, MacDonald C. and Grant M. H. (1996) Immortalized hepatocytes as in vitro model systems for toxicity testing: the comparative toxicity of menadione in immortalized cells, primary cultures of hepatocytes and HTC hepatoma cells. *Toxicol. In Vitro* 10: 721-727.
2. Ueno T., Miyamura T., Saito I. and Mizuno K. (1993). Immortalization of differentiated hepatocytes by a combination of a viral vector and collagen gel culture. *Hum. Cell* 6:126-136.
3. Miyazaki M., Mihara K., Kano Y., Tsuboi S., Endo A., Seshimo K. And Namba M. Immortalization of epithelial-like cells from human liver tissue with SV-40 T-antigene gene. *Exp. Cell. Res.* 206: 27-35
4. Bayad J., Bagrel D., Sabolovic N., Magdalous J. And Siest G. (1991). Expression and regulation of drug metabolizing enzymes in an immortalized rat hepatocyte cell line. *Biochem. Pharmacol.* 12:1345-1351.
5. Isom H. C., Woodworth C. D., Meng Y., Kreider J., Miller T. and Mengel L. (1992). Introduction of the ras oncogene transforms a simian virus 40-immortalized hepatocyte cell line without loss of expression of albumin and other liver-specific genes. *Cancer res.* 52:940-948.
6. Pfeifer M. A., Cole K., Smoot D. T., Weston A., Groopman J. D., Shields P. G. Vignaud J. M., Juillerat M., Lipsky M. M., Trump B. F. et al. (1993). Simian virus 40 large tumor antigen-immortalized normal human liver epithelial cells express hepatocyte characteristics and metabolize chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5123-5127.
7. Osanai M., Ogawa K. And Lee G. H. (1997) Phenobarbital causes apoptosis inconditionally immortalized mouse hepatocytes depending on deregulated c-myc expression: characterization of an unexpected effect. *Cancer Res.* 57: 2896-2903.
8. Ourlin J. C., Vilarem M. J., Daujaut M., Harricane M. C., Domergue J., Joyeux H., Baulieux J and Maurel P. (1997) Lipid-mediated transfection of normal adult human hepatocytes in primary culture. *Anal. Biochem.* 247: 34-44.
9. Bulera S.J., Haas M. J., sattle C.A., and Pitot H. C. (1997) Cell lines with heterogeneous phenotypes from a single isolation of albumin-SV40 T-antigen transgenic rat hepatocytes. *Hepatology* 25:1192-11203
10. Hering S. Griffin B.E. and Strauss M. (1991) Immortalization of fetal sinusoidal liver cells by polyoma virus large T antigen. *Exp. Cell Res.* 195:1-7.
11. Hohne M.W., Zieroth S., Vesper U. Kahl G.F. and Schwartz L.R. (1993) Carcinogen-induced diploid hepatocytes: sensitive target cells for transformation by c-Ha-ras oncogene. *Mol. Carcinog.* 7: 180-189.
12. Fischbach M., Cao H., Ibañez M. D., Tsacanas S., Alouani S., Montandon F., el Baraka M., Padieu P., Dreano M. and Chessebeuf-Pasdieu M. (1991) Maintenance of liver function in long-term culture of hepatocytes following in vitro or in vivo Ha-ras transfection. *Cell Biol. Toxicol.* 7: 327-345.
13. Sirica A.E. (1997) Immortalizing hepatocytes with truncated MET: a little bit of gene goes a long way. *Hepatology* 26: 510-512.
14. Widman L.E., Golden L.A. and Chasin L.A. (1979) Immortalization of normal liver functions in cell culture: rat hepatocyte-hepatoma cell hybrids expressing ornithine carbamoyltransferase. *J. Cell. Physiol.* 100: 391-400.
15. Immenschuh S., Petzinger E. and Katz N. (1993) Secretion of plasma proteins and its insulin-dependent regulation in rat hepatocyte-hepatoma hybrid cells. *Eur. J. Cell Biol.* 60: 256-260.
16. Katz N., Immenschuh S., Gerbrach U., Eigenbrodt E., Follmann W. And Petzinger E (1992) Hormone-sensitive carbohydrate metabolism in rat hepatocyte-hepatoma hybrid cells. *Eur. J. Cell Biol.* 57: 117-123
17. Petzinger E., Follmann W., Blumrich M., Walther P., Hennischel J., Bette P., Maurice M and Feldman G. (1994) Immortalization of rat hepatocytes by fusion with hepatoma cells. I. Cloning of hepatocytoma cell line with bile canaliculi. *Eur. J. Cell Biol.* 64: 328-338.

18. Reuter K. H., Van der Does A., Dunker P., Aktories K. and Katz N. (1995) Microinjection of ADP-ribosylated actin inhibits synthesis in hepatocyte-hepatoma hybrid cells. *Biochem J.* 319: 843-849.
19. Utesch D., Arand M., Thomas H., Petzinger E. and Oesch (1992). Xenobiotic-metabolizing enzyme activities in hybrid cell lines established by fusion of primary rat liver parenchymal cells with hepatoma cells. *Xenobiotica* 22: 1451-1457.
20. Yanai N., Suzuki M. and Obinata M. (1991) Hepatocyte xcell lines established from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T antigen gene. *Exp. Cell Res.* 197: 50-56.
21. Paul D., Hohne M., Pinkert C., Piasecki A., Ummelmann e. AND Brinster R. (1988) Immortalized differentiated hepatocyte lines derived from transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes. *Exp. Cell Res.* 175, 354-362.
22. Wu J. C., Merlino G., Cveklova K., Mosinger B. and Fausto N. (1994). Autonomous growth in serum-free medium production of hepatocellular carcinomas by differentiated hepatocyte lines that overexpress transforming growth factor alpha I. *Cancer Res.* 54:5964-5973.
23. Cartier N., Miquelot L., Tulliez M., Lepetit N., Levrat F., Grimber G., Briand P. and Khan A. (1992) Diet-dependent carcinogenesis of pancreatic islets and liver in transgenic mice expressing oncogenes under the control of the L-type pyruvate kinase gene promoter. *Oncogene* 7: 1413-1422.
24. Hirst-Ernst K. L., Paul D., Kahl G. F. and Hohne M. W. (1993) Expression of c-fos and c-myc protooncogenes in an immortalized hepatocyte line harboring SV40 T antigen and hGH as transgenes. *Transgenic. Res.* 2:101-108.
25. Wiebel F.J., Park S.S., Kiefer F. and Gelboin H. V., (1984) Expression of cytochrome P-450 in rat hepatoma cells. *Eur. J. Biochem.* 154: 455-462.
26. Singh J. and Roscher E. (1991) Induction of DNS damage by N-nitrosodiethylamine in rat hepatoma cells: correlation with cytochrome P-450-mediated aldrin epoxidase activity. *Mutagenesis* 6: 117-121.
27. Littlewood T., Hancock D., Danielian P., Parker M. and Evan G. (1995) A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucl. Acids Res.* 23:1686-1690.
28. Amicone L., Spagnoli F. M., Spath G., Giordano S., Tommasini C., Bernardini S., De Luca V., Della Rocca C., Weiss M. C., Comoglio P. M. and Tripodi M. (1997). Transgenic expression in the liver of truncated Met blocks apoptosis and permits immortalization of hepatocytes. *EMBO J.* 16:495-53.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Garattini-S (1994) Perspectives in the field of drug metabolism. *Drug-Metab-Rev.* **26**, 537-73.
- (2) Testa B (1995) The metabolism of drugs and other xenobiotics. Academic Press, London. ISBN 0-12-685391-6.
- (3) Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J, Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C. y Nebert, D.W. (1996). P-450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1-42.
- (4) Hakkola, J., Pelkonen, O., Pasanen, M. y Raunio, H. (1998). Xenobiotic-metabolizing cytochrome P-450 enzymes in the human feto-placental unit: role in intrauterine toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* **28**, 35-72.
- (5) Anzenbacher P, Anzenbacherova E. (2001) Cytochromes P-450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* **58**, 737-747.
- (6) Kanamura S, Watanabe J. (2000) Cell Biology of cytochrome P-450 in the liver, *Int Rev Cytol* 198,109.
- (7) Meyer-UA y Zanger-UM (1997) Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **37**, 269-296.
- (8) Lu AY. (1998) Drug-metabolism research challenges in the new millennium: individual variability in drug therapy and drug safety. *Drug Metab. Dispos* **26**, 1217-1222.
- (9) González, F.J. (1990). Molecular genetics of the P-450 superfamily. *Pharmacology and Therapeutics* **45**, 1-38.
- (10) Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M. Inui, Y. y Guengerich, F.P. (1994). Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **270**, 414-423.
- (11) Donato M.T. y Castell J.V. (2003). Strategies and molecular probes to investigate the role of Cytochrome CYP-450 in drug metabolism: Focus on in vitro studies.. *Clin Pharmacokinetics*, **42**,153-178.
- (12) Cereghini-S (1996) Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J.* **10**, 267-282.
- (13) Schrem H, Klempnauer J, Borlak J. (2002) Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: the hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression. *Pharmacol Rev* **54**, 129-158.

- (14) Honkakoski P, Negishi M (2000). Regulation of cytochrome P-450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J.* **347**, 321-337.
- (15) Liddle C, Goodwin B. (2002) Regulation of hepatic drug metabolism: role of the nuclear receptors PXR and CAR. *Semin Liver Dis.* **22**, 115-22.
- (16) Darlington-GJ, Wang-N y Hanson-RW (1995) C/EBP alpha: a critical regulator of genes governing integrative metabolic processes. *Curr-Opin-Genet-Dev.* **5**, 565-570.
- (17) Vallet-V, Antoine-B, Chafey-P, Vandewalle-A y Kahn-A (1995) Overproduction of a truncated hepatocyte nuclear factor 3 protein inhibits expression of liver-specific genes in hepatoma cells. *Mol Cell Biol.* **15**, 5453-5460.
- (18) Wang-ND, Finegold-MJ, Bradley-A, Ou-CN, Abdelsayed-SV, Wilde-MD, Taylor-LR, Wilson-DR y Darlington-GJ (1995) Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science.* **269**, 1108-1112.
- (19) Ktistaki-E and Talianidis-I (1997) Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1. *Science.* **277**, 109-112.
- (20) Spath-GF y Weiss-MC (1997) Hepatocyte nuclear factor 4 expression overcomes repression of the hepatic phenotype in dedifferentiated hepatoma cells. *Mol Cell Biol.* **17**, 1913-1922.
- (21) Kaestner-KH, Hiemisch-H y Schutz-G (1998) Targeted disruption of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 3gamma results in reduced transcription of hepatocyte-specific genes. *Mol Cell Biol.* **18**, 4245-4251.
- (22) Chojkier-M (1995) Regulation of liver-specific gene expression. *Prog Liver Dis.* **13**, 37-61.
- (23) Papavassiliou-AG (1997) Transcription factors in Eukaryotes. *Landes Bioscience. Austin, Texas, USA.* ISBN 3-540-61538-5.
- (24) Lee-YH, Williams-SC, Baer-M, Sterneck-E, Gonzalez-FJ y Johnson-PF (1997) The ability of C/EBP beta but not C/EBP alpha to synergize with an Sp1 protein is specified by the leucine zipper and activation domain. *Mol-Cell-Biol.* **17**, 2038-2047.
- (25) Duncan-SA, Navas-MA, Dufort-D, Rossant-J y Stoffel-M (1998) Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science.* **281**, 692-695.
- (26) Tronche, F. y Yaniv, M. (1992). HNF1, a homeoprotein member of the hepatic transcription regulator network. *Bioessays*, **9**, 579-587.
- (27) Griffo, G. Hamon-Benais, c. Angrand, PO. et al (1993). HNF4 and HNF1 as well as a panel of hepatic functions are extinguished reexpressed in parallel in chromosomally reduced rat hepatoma-human fibroblast hybrids. *J. Cell Biol.* **4**, 887-898.

- (28) Waxman DJ. (1999) P-450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys.* **369**, 11-23.
- (29) Xie, W. y Evans, R. (2001) Orphan Nuclear Receptors: The Exotics of Xenobiotics. *Biological Chemistry* **276**, 37739-37742.
- (30) Aranda, A. y Pascual, A. (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* **81**, 1269-1304.
- (31) Masahiko N, Honkakoski P. (2000) Induction of drug metabolism by nuclear receptor CAR: molecular mechanisms and implications for drug research. *Eur J Pharm Sci.* **11**, 259-264.
- (32) Zelko I, Negishi M. (2000) Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P-450 genes. *Biochem Biophys Res Commun.* **277**, 1-6.
- (33) Quattrochi, L. y Guzelian, P. (2001) Cyp3A regulation: from pharmacology to nuclear receptors. *Drug Metab Dispos* **29**, 615-622.
- (34) Sueyoshi T, Negishi M. (2001) Phenobarbital response elements of cytochrome P-450 genes and nuclear receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **41**, 123-143.
- (35) Tzamelis I, Moore DD. (2001) Role reversal: new insights from new ligands for the xenobiotic receptor CAR. *Trends Endocrinol Metab* **12**, 7-10.
- (36) Maglich JM, Stoltz CM, Goodwin B, Hawkins-Brown D, Moore JT, Kliewer SA (2002). Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol Pharmacol.* **62**, 638-646.
- (37) Goodwin B, Redinbo MR, Kliewer SA (2002). Regulation of cyp3a gene transcription by the pregnane x receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 1-23.
- (38) Willson TM, Kliewer SA. (2002) PXR, CAR and drug metabolism. *Nat Rev Drug Discov.* **1**, 259-266.
- (39) Kliewer SA, Goodwin B, Willson TM. (2002) The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev.* **23**, 687-702.
- (40) Kroetz DL, Yook P, Costet P, Bianchi P, Pineau T. (1998) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha controls the hepatic CYP4A induction adaptive response to starvation and diabetes. *J Biol Chem.*; **273**, 31581-31589.
- (41) Boelsterli UA, Bedoucha M. (2002) Toxicological consequences of altered peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression in the liver: insights from models of obesity and type 2 diabetes. *Biochem Pharmacol.* **63**, 1-10.



- (42) Cowart LA, Wei S, Hsu MH, Johnson EF, Krishna MU, Falck JR, Capdevila JH (2002) . The CYP4A isoforms hydroxylate epoxyeicosatrienoic acids to form high affinity peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem.* **277**, 35105-12.
- (43) Rodriguez-Antona, C., Jover, R., Gómez-Lechón, M.J. y Castell, J.V. (2000). Quantitative RT-PCR measurement of human cytochrome P-450's: application to drug induction studies. *Arch. Biochem. Biophys.* **376**, 109-116.
- (44) Pérez, G. Tabares, B. Jover, R. Gómez-Lechón, MJ. y Castell, JV. (2003).Semi-automatic quantitative RT-PCR to measure CYP induction by drugs in human hepatocytes. *Toxicol In Vitro* **17**, 643-649.
- (45) Gómez-Lechón, M.J., López, P., Donato, T., Montoya, A., Larrauri, A., Giménez, P., Trullenque, R., Fabra, R. y Castell, J.V. (1990). Culture of human hepatocytes from small surgical liver biopsies. Biochemical characterization and comparison with in vivo. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* **26**, 67-74.
- (46) Jover-R, Ponsoda-X, Gómez-Lechón-MJ y Castell-JV (1992) Potentiation of heroin and methadone hepatotoxicity by ethanol. An in vitro study using cultured human hepatocytes. *Xenobiotica.* **22**, 471-478.
- (47) Jover-R, Ponsoda-X, Gómez-Lechón-MJ y Castell-JV (1993) Cocaine hepatotoxicity: Two different toxicity mechanisms for phenobarbital-induced and non-induced rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* **46**, 1967-74.
- (48) Bort, R., Ponsoda, X., Carrasco, E., Gómez-Lechón, M.J. y Castell, J.V. (1996). Metabolism of aceclofenac in humans. *Drug Metabolism and Disposition* **24**, 834-841.
- (49) Bort, R., Ponsoda, X., Carrasco, E., Gómez-Lechón, M.J. y Castell, J.V. (1996). Comparative metabolism of the nonsteroidal antiinflammatory drug, aceclofenac, in the rat, monkey, and human. *Drug Metabolism and Disposition* **24**, 969-975.
- (50) M.I. Guillén, M. J. Gómez-Lechón, T. Nakamura y J. V. Castell. (1996). The hepatocyte growth factor regulates the synthesis of acute-phase proteins in human hepatocytes. Divergent effects on IL-6 synthesis. *Hepatology* **23**, 1345-1352.
- (51) Donato-MT, Guillen-MI, Jover-R, Castell-JV y Gomez-Lechon-MJ (1997) Nitric oxide-mediated inhibition of cytochrome P-450 by interferon-gamma in human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* **281**, 484-490.
- (52) M. T. Donato, M. J. Gómez-Lechón R. Jover, T. Nakamura, y J. V. Castell.. (1998). Human hepatocyte growth factor down regulates the expression of cytochrome P-450 isozymes in human hepatocytes in primary culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther* **284**, 760-767.
- (53) Bort, R. Ponsoda, X Jover, R. Gómez-Lechón M.J y Castell, J.V (1999). Diclofenac toxicity to hepatocytes: A role for drug metabolism in cell toxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **288**, 65-72.

- (54) Gomez-Lechon, M., Donato, T., Jover, R., Rodriguez, C., Ponsoda, X., Glaise, D., Castell, J. y Guguen-Guillouzo, C. (2001) Expression and induction of a large set of drug-metabolizing enzymes by the highly differentiated human hepatoma cell line BC2. *Eur J Biochem* **268**, 1448-1459.
- (55) Klocke, R. Gómez-Lechón, M.J. Ehrhardt, A. Mendoza-Figueroa, T. Donato, T. López-Revilla, R. Castell, J.V. y Paul, D. (2002). Establishment and characterization of immortal hepatocytes derived from various transgenic mouse lines. *BBRC* **294**, 864-871.
- (56) Jover-R, Bort-R, Gomez-Lechon-MJ y Castell-JV (1998) Re-expression of C/EBP alpha induces CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genes in HepG2 cells. *FEBS Lett.* **431**, 227-230.
- (57) Gómez-Lechón M. J., Jover R., Donato M. T., Ponsoda X., Cristina Rodriguez, Stenzel K. G., Klocke R., Paul D., Guillén I., Bort R. y Castell J. V (1998). Long-term expression of differentiated hepatic functions and cytochrome P-450 in hepatocytes cultured in three-dimensional collagen matrix.. *J. Cell Physiol* **17**, 553-562.
- (58) Jover, R., Bort, R., Gomez, L., MJ y Castell, J. (2001) Role of hepatocyte nuclear factor 4 in the expression of cytochromes P-450 in cultured human hepatocytes: Studies using an adenovirus-mediated antisense targeting strategy. *Hepatology* **33**, 668-675.
- (59) Naar AM, Lemon BD, Tjian R. (2001) Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem* **70**, 475-501.
- (60) Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. (1999) Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 140-147.
- (61) Rodríguez-Antona C. Bort, R. Jover, R. Tindberg N., Ingelman-Sundberg M., Gómez-Lechón, M.J. y Castell J.V. (2003). Transcriptional regulation of human CYP3A4 basal expression by CCAAT enhancer-bindingprotein alpha and hepatocyte nuclear factor-3 gamma. *Molecular Pharmacol* **63**, 1180-1189.